

De l'étiologie du farcin de zébus tchadiens : nocardiose ou mycobactériose ?

II. — Composition lipidique

par ASSELINEAU, J.* et LANEELLE, M. A.* et G. CHAMOISEAU**

RÉSUMÉ

L'analyse des constituants lipidiques de l'Actinomycète isolé d'abcès ganglionnaires chez les zébus tchadiens et dont l'étude bactériologique est décrite dans l'article précédent, montre sans ambiguïté que ce germe est à ranger parmi les Mycobactéries.

INTRODUCTION

Les éléments fournis par des observations exposées dans un travail précédent (3) ne permettaient pas d'assimiler l'Actinomycétale des zébus du Tchad à *N. farcinica* telle qu'elle est présentée quant à certains de ses caractères par différents auteurs. Et en admettant même qu'il fût une variété tchadienne de *N. farcinica* il importait de pénétrer plus avant dans sa connaissance afin de définir sa *personnalité* particulière.

Dans ce dessein, nous avons envisagé avant tout l'étude des lipides, étude qui nous était dès l'abord inspirée par la présence à la surface des milieux de COLETOS et de LÖEWENSTEIN d'une auréole irisée en imposant à première vue pour la diffusion par vagues d'un produit gras à partir des colonies.

Des études antérieures (6, 7) avaient montré que, d'après leur composition lipidique, il est possible de caractériser des souches de *Nocardia* et de Mycobactéries.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel bactérien :

Les germes étudiés proviennent :
— d'une part de la récolte d'une culture en masse de l'Actinomycétale sur la gélose tryptone sérum, après un mois et demi d'incubation ;
— d'autre part de la récolte des voiles du germe après adaptation au bouillon tryptone sérum, après un temps identique d'incubation.

Les voiles microbiens sont expédiés au laboratoire d'analyses dans les tubes scellés contenant de l'alcool à 95° pour éviter la croissance de moisissures. Trois souches ont été de la sorte soumises à l'examen.

Isolement des lipides :

Les divers lots de bacilles ont été successivement extraits par un mélange (1 : 1 v/v) d'alcool et d'éther, et par le chloroforme, selon la technique d'ANDERSON (1). Nous avons utilisé environ 2 g de bacilles (poids sec) dans le cas des cultures sur milieu solide, et environ 0,5 g de bacilles dans le cas des cultures sur milieu liquide.

Techniques d'analyse :

Les diverses techniques utilisées dans le pré-

* Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Toulouse, Toulouse-31.

** I. E. M. V. T. Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy (Tchad).

sent travail ont déjà été décrites dans des publications antérieures (6, 7). Nous ajouterons seulement les précisions suivantes :

— Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées avec de l'acide silicique G. (Merck) pour les chromatographies analytiques, et de l'acide silicique PF₂₅₄ pour les chromatographies préparatives.

L'analyse des extraits chloroformiques a été réalisée en utilisant le système de solvant : chloroforme-méthanol 9 : 1 (v/v) ; celle des esters mycoliques : éther de pétrole (Eb. 55°)-éther 8 : 2 (v/v) (8).

— Les chromatographies en phase gazeuse ont été effectuées sur un appareil Aerograph modèle 204, équipé d'une colonne de silicone SE-30 à 10 p. 100 sur Chromosorb W. Les chromatographies pyrolytiques ont été réalisées selon la technique d'ETEMADI (5).

— Le tréhalose a été mis en évidence par chromatographie sur papier Whatman n° 2, ascendante, avec le système de solvant isopropanol-pyridine-eau-acide acétique 8 : 8 : 4 : 1 (v/v) ; la révélation est effectuée par le réactif au nitrate d'argent (11).

RÉSULTATS

Le tableau I montre les teneurs en lipides de divers lots de cette bactérie, cultivée soit sur milieu solide, soit sur milieu liquide. Les diffé-

* Ce travail fait partie de la thèse de Doctorat ès Sciences que Mme Marie-Antoinette LANEELLE soutiendra devant la Faculté des Sciences de Toulouse en 1969. Références antérieures (6, 7, 9, 10).

rences de pourcentage observées entre ces deux modes de cultures, ou d'un lot à l'autre, ne sont pas significatives. Mais il faut remarquer que l'extrait chloroformique représente une partie relativement importante des lipides libres : la comparaison avec les résultats obtenus dans le cas de *Nocardiae* ou de *Mycobactéries* montre que, sous cet aspect, les bactéries étudiées se rapprochent plus des *Mycobactéries* que des *Nocardiae*.

Extraits alcoolo-éthérés :

Etant donné la faible quantité de matériel disponible les séparations ont été effectuées par chromatographies en couche mince, soit à l'échelle analytique, soit à l'échelle préparative.

Nous avons mis en évidence dans les extraits alcoolo-éthérés des *glycérides*, caractérisés par leur R_f en couche mince, et leur saponification en acides gras et glycérol.

En révélant le chromatogramme sur couche mince par un réactif spécifique des esters phosphoriques (4), on observe trois taches, de R_f 0,55, 0,42 et 0,27. La tache R_f 0,55 est également révéla- ble par la ninhydrine : ces propriétés correspondent à celles de *phosphatidyléthanolamines*. La tache R_f 0,27 présente un comportement semblable à celui des *mannosides de phosphatidyl- inositols*, constituants constants des bactéries de l'ordre des Actinomycétales (6, 7). La présence de ces derniers constituants est confirmée par la détection de mannose et d'inositol dans les hydrolysats acides des lipides bruts, par chroma- tographie sur papier.

Au cours de travaux antérieurs (6, 7), nous avons montré que les *acides gras* et plus par-

TABLEAU N° I

Comparaison de la teneur en lipides libres (exprimée en p.100 du poids sec) de l'Actinomycétale isolée des bovins du Tchad et de *Nocardiae* et *Mycobactéries* authentiques.

Souches	Actinomycétale du Tchad		<i>Nocardia</i>		<i>Mycobactérium</i>		
	Milieu solide	Milieu liquide	<i>Asteroides</i> 316	<i>Brasiliensis</i>	<i>Tuberculosis</i> H 37 RV H 37 Ra		<i>Bovis</i> B.C.G.
Extrait alcoolo-éthéré	4,2 à 5,5	5,0 à 6,6	15,5	20,5	12,7	9,6	14,3
Extrait chloroformique	3,3 à 3,0	3,0 à 2,0	1,6	0,3	8,4	6,5	11,1
Lipides libres totaux	7,5 à 8,5	8,0 à 8,6	17,1	20,8	21,1	16,1	25,5

ticulièrement les acides gras hydroxylés, permettent de différencier nettement les *Mycobactéries*, *Nocardiae* et *Streptomycètes*. Nous avons préparé, par saponification, les acides gras totaux de l'extrait alcool-éthéré. Ces acides ont été méthylés par le diazométhane et les esters méthyliques ont été séparés en deux fractions par chromatographie en couche mince préparative : fraction d'esters ordinaires et fraction d'esters hydroxylés.

Les esters ordinaires ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse : les diverses préparations présentent un profil tout à fait semblable (voir figure). On remarque la présence de tuberculostéarate de méthyle (constituant des lipides de *Mycobactéries*, *Nocardiae* et de certains *Streptomycètes*) et d'esters d'acides gras à chaîne normale jusqu'au terme en C_{24} (tétracosanoate de méthyle). La présence, en quantité notable, d'acides gras ayant plus de 20 atomes de carbone est caractéristique des *Mycobactéries* (par comparaison avec les *Nocardiae* et les *Streptomycètes*).

Les esters d'acides gras hydroxylés donnent deux taches par chromatographie en couche mince analytique, que nous n'avons pas cherché à séparer, en raison de la faible quantité de matériel. Ces esters sont des esters d'acides mycoliques, ainsi qu'il résulte :

— de leur chromatographie pyrolytique, qui fournit un seul pic identifié au tétracosanoate de méthyle,

— de leur poids moléculaire, déterminé par spectrométrie de masse : on observe en effet des pics moléculaires (correspondant à l'ion moléculaire après perte de H_2O et CH_3OH) à m/e 1072, 1080, 1110, 1126 et 1140.

Dans les spectres de masse, en dehors des pics moléculaires, on observe un pic important à m/e 382 correspondant au tétracosanoate de méthyle, et des pics d'aldéhyde méromycolique (en particulier à m/e 780 et 794). A partir du méroaldéhyde 794, on peut calculer pour un de ces acides mycoliques un poids moléculaire de 1126, qui correspond à un acide mycolique ayant 3 insaturations (double liaison ou cycle propanique).

Extrait chloroformique :

Les extraits obtenus dans le cas des diverses souches ont été dissous dans l'éther et précipités

par addition de méthanol, ce qui fournit un solide blanc amorphe, semblable aux « cires purifiées » des *Mycobactéries*. La chromatographie sur couche mince analytique montre que cette préparation est constituée par deux substances différentes (Fig. 1).



Fig. 1. — Chromatographie sur couche mince analytique

1. — Myristate de méthyle. 2. — Palmitate de méthyle. 3. — Ester en C_{18} insaturé. 4. — Stéarate de méthyle. 5. — Tuberculostéarate de méthyle. 6. — Eicosanoate de méthyle. 7. — Docosanoate de méthyle. 8. — Tétracosanoate de méthyle. 9. — Non identifié.

La chromatographie sur couche mince préparative a été réalisée sur le produit obtenu à partir des cultures sur milieu solide. On obtient ainsi :

— une substance de R_f élevé, dont le spectre I. R. montre une bande de carboxyle ionisé (6, 5) ; après lavage de sa solution étherée par l'acide, puis méthylation par le diazométhane, on isole un produit ayant toutes les propriétés du *mycolate de méthyle*. Le mode d'obtention montre que, dans l'extrait chloroformique, l'acide mycolique était présent sous forme de sel,

— une substance de faible R_f , dont le mode de migration et le spectre I. R. (en particulier bande caractéristique à $10,1 \mu$) sont semblables

à ceux du « cord factor » (échantillon isolé de B. C. G.). L'identification de cette substance au « cord factor » a été établie par saponification : la partie éthérosoluble obtenue consiste uniquement en acides mycoliques (identifiés par le comportement en couche mince des esters méthyliques, et par la réaction caractéristique de pyrolyse) et la partie hydrosoluble renferme uniquement du tréhalose (identifié par chromatographie sur papier, après désalification).

Il faut remarquer que ces deux types de constituants représentent l'essentiel de la fraction insoluble dans le méthanol de l'extrait chloroformique et que, par la suite, on n'y trouve pas (en quantité notable) de composés plus complexes semblables aux cires D. Ces souches de Mycobactéries sont donc relativement riches en « cord factor ».

CONCLUSIONS

Ce travail montre que les Actinomycétales isolées de bovins du Tchad atteints de farcin ont une composition lipidique qui, d'après nos travaux antérieurs (6, 7) est caractéristique des Mycobactéries.

Nous avons fait remarquer la richesse relative en fraction extraite par le chloroforme et nos conclusions s'appuient sur :

— La présence d'acides gras à chaîne normale supérieurs à C₂₀ dans les acides gras totaux,

— la présence d'acides gras β-hydroxylés du type mycolique, pyrolysables avec libération d'acide tétracosanoïque,

— la présence, dans l'extrait chloroformique, de « cord factor » (des substances de ce type

n'ont, jusqu'ici, jamais été trouvées dans des *Nocardiae*).

Ces trois points démontrent, sans ambiguïté, qu'il s'agit de Mycobactéries. Des préparations de « cord factor » ont été obtenues à partir de toutes les souches de Mycobactéries étudiées (y compris saprophytes et « atypiques ») (2). L'obtention d'acide tétracosanoïque par pyrolyse des acides mycoliques exclut *M. tuberculosis* et *M. bovis* (dont les acides mycoliques libèrent par pyrolyse, de l'acide hexacosanoïque) (2).

Devant les révélations de l'analyse chimique de ses lipides, il s'avère que l'Actinomycétale régulièrement isolée des adénites suppurées des zébus du Tchad n'est pas une variété de *Nocardia farcinica*, qu'il n'est pas une *Nocardia* non plus, mais bien une Mycobactérie.

Certes, il reste à démontrer qu'il est seul en cause dans l'étiologie de ces adénites.

Pendant, la présence dans ces lésions de Mycobactéries pathogènes expérimentalement pour le cobaye inclinerait à leur reconnaître un rôle pathogène naturel, et légitime, s'il le faut encore, l'allergie à la tuberculine que peuvent accuser les malades.

Même si le problème étiologique de ces adénites n'est pas tranché, il demeure que l'étude des lipides constitutifs de ce germe fournit un exemple supplémentaire de l'utilité d'une étude approfondie pour le diagnostic et la classification de certaines Actinomycétales.

Nous remercions vivement Monsieur le Docteur B. C. DAS, chef du Service de Spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances naturelles du C. N. R. S. pour les spectres de masse.

SUMMARY

About the etiology of streptothrichosis of Chad zebu cattle : Nocardiosis or mycobacteriosis. II. Lipidic composition

The analysis of the lipidic components of the actinomycete that is isolated in Chad zebu cattle and the bacteriological study of which is reported in the preceding paper indicates clearly that this germ must be ranged among the mycobacteria.

RESUMEN

En cuanto a la etiología de la estreptotricosis de los cebues de Chad : ¿ nocardiosis o micobacteriosis ? II. Composición lipídica

La determinación de los constituyentes lipídicos del actinomiceto, aislado de abscesos ganglionares en los cebues de Chad y cuyo estudio bacteriológico está descrito en la ponencia precedente, muestra sin ambigüedad que se debe poner el dicho germen entre las micobacterias.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON (R. J.). — The chemistry of the lipids of the tubercle bacillus and certain other micro-organisms. *Fortis. chem. organ. Naturs.*, 1939, **3**, 145.
2. ASSELINEAU (J.). — The Bacterial lipids. Ed. Hermann, Paris, 1966.
3. CHAMOISEAU (G.). — De l'étiologie du farcin de zébus tchadiens. Nocardiose ou Mycobactériose. I. Etude bactériologique et biochimique. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* à paraître.
4. DITTMER (J. C.) and LESTER (R. L.). — A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. lipid Res.*, 1964, **5**, 126.
5. ETEMADI (A. H.). — Technique micro-analytique d'étude de structure d'esters α -ramifiés, β -hydroxylés. Chromatographie en phase vapeur et spectrométrie de masse. *Bull. Soc. Chim. fr.*, 1964, **7**, 1537.
6. LANEELLE (M. A.), ASSELINEAU (J.) et CASTELNUOVO (G.). — Etude sur les Mycobactéries et les Nocardiae. IV. Composition des lipides de *Mycobacterium rhodocrous*, *M. Pellegrino* sp. et de quelques souches de Nocardiae. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **108**, 69-82.
7. LANEELLE (M. A.), ASSELINEAU (J.) et CASTELNUOVO (G.). — Relations chimiques et immunologiques chez les Actinomycétales. IV. Composition chimique de 4 souches de *Streptomyces* et d'une souche de *N. (strep) gardneri*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, **114**, 305-312.
8. LANEELLE (G.). — Nature des acides mycoliques de *Mycobacterium paratuberculosis* application de la chromatographie sur couche mince à leur fractionnement. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1963, **257**, 781-783.
9. LANEELLE (M. A.). — Sur la relation entre les cétones à haut poids moléculaire isolées de *Nocardia brasiliensis* et les acides nocardomycoliques. *C. R. Acad. Sci. Paris. Ser. C.* 1966, **263**, 560-563.
10. LANEELLE (M. A.). — Stéréochimie d'acides gras α -hydroxylés isolés d'une souche de *Streptomyces*. *Experientia*, 1968, **24**, 541-542.
11. TREVELYAN (N. E.), PROCTOR (D. P.) and HARRISON (J. S.). — Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature, London*, 1950, **166**, 444.